



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12N 15/57, 9/64, 5/10, C07K 16/40, G01N 33/573, C12Q 1/68, 1/37</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/53077</b>  (43) Date de publication internationale: 21 octobre 1999 (21.10.99)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00807 (22) Date de dépôt international: 7 avril 1999 (07.04.99)  (30) Données relatives à la priorité: 98/04389 8 avril 1998 (08.04.98) FR  (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).  (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): OUMET, Tanja [CA/FR]; 3, rue Jules César, F-75012 Paris (FR). GROS, Claude [FR/FR]; 31, rue de Fiers, F-75015 Paris (FR). ROSE, Christiane [FR/FR]; 20, place Henri IV, F-78320 Le Mesnil Saint Denis (FR). BÓNHOMME, Marie-Chantal [CA/FR]; 910 Lapointe, Saint-Laurent, Québec H4L 1J8 (CA). FACCHINETTI, Patricia [FR/FR]; 31, avenue du Général de Gaulle, F-94420 Le Plessis Trévisé (FR). SCHWARTZ, Jean-Charles [FR/FR]; 9, villa Seurat, F-75014 Paris (FR).  (74) Mandataires: BOLENSKY, Michel etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: NOVEL NEP II MEMBRANE METALLOPROTEASE AND ITS USE FOR SCREENING INHIBITORS USEFUL IN THERAPY (54) Titre: NOUVELLE METALLOPROTEASE MEMBRANAIRE NEP II ET SON UTILISATION POUR LE CRIBLAGE D'INHIBITEURS UTILES EN THERAPIE  (57) Abstract  The invention concerns an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected among the sequence SEQ ID n° 2 or n° 4, a sequence derived from or homologous with said sequence SEQ ID n° 2 or n° 4, or a biologically active fragment of said sequence SEQ ID n° 2 or n° 4, said isolated polypeptide being designated as "NEP II", and the use of said NEP II polypeptide for screening inhibitors useful in therapy.  (57) Abrégé  Cette invention concerne un polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi la séquence SEQ ID n° 2 ou n° 4, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n° 2 ou n° 4, ou un fragment biologiquement actif de ladite séquence SEQ ID n° 2 ou n° 4, ledit polypeptide isolé étant désigné par "NEP II", ainsi que l'utilisation dudit polypeptide NEP II pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroon			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

- 1 -

" Nouvelle métalloprotéase membranaire NEP II et son utilisation pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie".

La présente invention a pour objet une nouvelle métalloprotéase membranaire appelée NEP II et son utilisation, notamment pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie.

5 Les métalloprotéases membranaires telles que la néprilysine (NEP I, EC 3.4.24.11) jouent un rôle important dans l'activation ou l'inactivation des messagers peptidiques neuronaux ou hormonaux. Leur inhibition sélective par des composés synthétiques a déjà conduit à des médicaments couramment utilisés en thérapeutique ou en cours de développement clinique,  
10 notamment dans les domaines gastroentérologique (Baumer et coll., Gut, 1992, 33 : 753-758) et cardiovasculaire (Gros et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88 : 4210-4214). L'isolement des ADNc de gènes de nouvelles métalloprotéases apparentées est de nature à permettre le développement de nouvelles classes d'inhibiteurs spécifiques à applications thérapeutiques  
15 prometteuses. C'est ainsi que le clonage et l'expression du gène de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Xu et coll., Cell, 1994, 78 : 473-485) a permis la mise au point d'inhibiteurs potentiellement utiles dans certaines affections cardiovasculaires.

20 Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence une nouvelle métalloprotéase membranaire appartenant à la famille ECE/NEP/Kell (Lee S. et coll., 1991, PNAS 88(14):6353-57), qu'ils ont appelée NEP II.

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi la séquence SEQ ID  
25 n°2 ou SEQ ID n° 4, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ou un fragment biologiquement actif de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ledit polypeptide isolé étant désigné par «NEP II ».

La séquence SEQ ID n° 2 est la séquence d'acides aminés de  
30 NEP II identifiée chez le rat.

La séquence SEQ ID n° 4 est une séquence (partielle) d'acides aminés de NEP II identifiée chez l'homme.

Par polypeptide "dérivé", on entend tout polypeptide résultant d'une modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4, c'est-à-dire par mutation, délétion, addition, substitution et/ou modification chimique d'au moins un acide aminé, ou toute isoforme ayant une séquence identique à la séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 mais contenant au moins un acide aminé sous la forme D.

Lesdites substitutions sont de préférence des substitutions conservatives, c'est-à-dire des substitutions d'acides aminés de même classe, tels que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Par polypeptide "homologue", on entend plus particulièrement tout polypeptide isolable chez d'autres espèces de mammifères que le rat ou l'homme.

Lesdits polypeptides homologues présentent préférentiellement une homologie de séquence supérieure à 70 %, de préférence encore supérieure à 75 %, avec la séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 complète, l'homologie étant particulièrement élevée dans la partie dudit polypeptide, contenant le site actif.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie (i.e. identité) est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des

deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

Lesdits polypeptides dérivés, homologues ou les fragments polypeptidiques du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 sont biologiquement actifs, c'est-à-dire présentent des propriétés biologiques identiques ou similaires des propriétés biologiques du polypeptide NEP II de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4, à savoir une activité métalloprotéasique.

Les fragments polypeptidiques préférés comprennent la séquence du site actif responsable de la liaison de l'atome de zinc indispensable à la catalyse. Ce site actif a été identifié comme englobant les résidus  $HEX_1X_2H$ ,  $X_1$  et  $X_2$  représentant des acides aminés variables. Il s'agit en particulier de la séquence HEITH (acides aminés 608 à 612 de la séquence SEQ ID n° 2) dans le polypeptide NEP II chez le rat et l'homme.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi la séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n° 3, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n° 3, ou leurs séquences complémentaires.

La séquence SEQ ID n° 1 est la séquence d'ADNc comprenant la phase codante pour NEP II identifiée chez le rat.

La séquence SEQ ID n° 3 est la séquence d'ADNc comprenant (partiellement) la phase codante pour NEP II identifiée chez l'homme.

Par séquence nucléotidique "dérivée", on entend toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide dérivé de NEP II tel que défini précédemment, c'est-à-dire une séquence résultant d'une modification de la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3, notamment par mutation, délétion, addition ou substitution d'au moins un nucléotide. Sont en particulier comprises les séquences dérivées de la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3 par dégénérescence du code génétique.

Par séquence "homologue", on entend plus particulièrement toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide NEP II homologue

du polypeptide NEP II de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 chez d'autres espèces de mammifères que le rat ou l'homme.

Une telle séquence homologue présente préférentiellement une homologie supérieure à 70 %, de préférence encore supérieure à 75 %, avec la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3, l'homologie étant particulièrement élevée dans la partie centrale de la séquence codant pour le polypeptide NEP II.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID n° 1 ou n° 3, dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent ( $T_m$ ).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases,  $T_m$  est définie par la relation :  $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \text{Log}(\text{concentration en cations}) - 0,63(\% \text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$  (Sambrook et al, Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases,  $T_m$  est définie par la relation :  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ .

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 15°C en dessous de  $T_m$ , de préférence encore de 5 à 10°C en dessous de  $T_m$  (forte stringence), et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour la production d'une protéine recombinante NEP II selon l'invention, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier.

Un système efficace de production d'une protéine recombinante nécessite de disposer d'un vecteur, par exemple d'origine plasmidique ou virale, et d'une cellule hôte compatible.

L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, 5 comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple des levures, des cellules d'insectes, de mammifères, telles que les cellules CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible.

Le vecteur doit comporter un promoteur, des signaux d'initiation 10 et de terminaison de la traduction, ainsi que les régions appropriées de régulation de la transcription. Il doit pouvoir être intégré dans la cellule et peut éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de 15 l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un 20 hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation.

Des exemples de vecteurs d'intérêt sont les plasmides pcDNA 3.1, PCR2.1 (Invitrogen), ou pMbac (Stratagene).

L'invention vise les vecteurs de clonage et/ou d'expression 25 contenant une séquence nucléotidique selon l'invention, et vise en outre les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou 30 l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant selon l'invention.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante est elle-même comprise dans la présente invention, et se caractérise en ce que l'on cultive les cellules transfectées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant selon l'invention, et que  
5 l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées séparément ou en combinaison, telles que le fractionnement, les  
10 méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou de sérum polyclonal, etc.

La présente invention a également pour objet les sondes nucléotidiques, capables de s'hybrider fortement et spécifiquement avec une  
15 séquence d'acide nucléique, d'un ADN génomique ou d'un ARN messager, codant pour un polypeptide selon l'invention. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier (Sambrook et al., 1989), de préférence à des conditions de forte stringence, c'est-à-dire des conditions de  
20 température comprises entre ( $T_m$  moins  $5^\circ\text{C}$ ) et ( $T_m$  moins  $15^\circ\text{C}$ ) et de préférence encore, à des conditions de température comprises entre  $T_m$  et ( $T_m$  moins  $10^\circ\text{C}$ ) (forte stringence).

Les sondes préférées sont notamment les sondes oligonucléotidiques choisies parmi les séquences SEQ ID n°5 à SEQ ID n°27.

25 De telles sondes sont utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction en chaîne par polymérase) ou toute autre variante de celle-ci.

De telles sondes sont également utiles dans un procédé de détection de l'expression du polypeptide NEP II dans un échantillon cellulaire  
30 ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à :



- préparer l'ARN dudit échantillon ou desdites cellules ou dudit tissu;

- mettre en contact ledit ARN obtenu avec au moins une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique selon l'invention, ladite sonde pouvant être  
5 notamment une sonde oligonucléotidique de séquence SEQ ID n° 5 à SEQ ID n° 27 ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec ladite sonde indicatrice de l'expression du polypeptide NEP II.

10

L'invention a également pour objet les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un polypeptide selon l'invention administré à un animal, et sont capables de reconnaître  
15 spécifiquement un polypeptide selon l'invention. L'invention a en outre pour objet l'utilisation de ces anticorps pour la purification ou la détection d'un polypeptide NEP II dans un échantillon biologique.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre la protéine NEP II, produite par exemple par  
20 recombinaison génétique suivant la méthode décrite ci-dessus, selon les modes opératoires usuels.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, 1975, vol. 256, pp 495-497).

25 Les anticorps peuvent être des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub>. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués.

Les anticorps selon l'invention sont particulièrement utiles pour détecter la présence de NEP II.

30 La présente invention a donc pour objet un procédé de détection immunologique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un anticorps détectable selon l'invention ;
- détecter la présence dudit anticorps, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.

5 Par "anticorps détectable", on entend soit un anticorps marqué par un groupement détectable, tel qu'un groupement radioactif, enzymatique, fluorogène ou fluorescent, etc., soit un anticorps auquel se lie un autre anticorps lui-même marqué de manière détectable.

10 Les anticorps selon l'invention peuvent ainsi permettre d'évaluer une surexpression du polypeptide II, qui peut être indicatrice de cellules tumorales neuroendocriniennes notamment.

L'invention a également pour objet un procédé d'identification de composés substrats du polypeptide NEP II tel que défini précédemment, dans  
15 lequel on met en contact lesdits composés, éventuellement marqués, avec le polypeptide NEP II, et on évalue la coupure desdits composés par NEP II, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II envers lesdits composés substrats.

De tels substrats spécifiques de NEP II peuvent être en  
20 particulier utilisés dans un procédé de détection de l'activité métalloprotéasique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide  
25 NEP II obtenu selon l'invention, ledit composé substrat étant éventuellement marqué ;
- évaluer la coupure dudit composé substrat, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

Les cellules susceptibles d'être ainsi testées sont notamment les  
30 cellules transfectées par un polynucléotide codant pour le polypeptide NEP II tel que défini précédemment. Les extraits tissulaires susceptibles d'être testés sont en particulier les membranes de testicule, particulièrement riches en

métalloprotéase NEP II.

L'invention a par ailleurs pour objet un procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique du polypeptide NEP II selon l'invention, dans lequel on met en contact lesdits composés avec  
5 le dit polypeptide NEP II et on évalue le taux d'inhibition de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

Les composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique de NEP II sont de préférence des peptides courts de 2 ou 3 acides aminés  
10 naturels ou modifiés.

Les peptides synthétiques identifiés comme inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II par ce procédé de criblage peuvent être couplés à un groupe chélateur de zinc tels que les groupes thiol, phosphate ou  
15 acide hydroxamique, selon les techniques classiques connues de l'homme du métier. Le composé inhibiteur obtenu est un bon candidat en tant que principe actif d'un médicament, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ledit groupe chélateur peut éventuellement être protégé de manière transitoire, par exemple par un ester de thiol, pour améliorer la biodisponibilité dudit principe actif.

20 Le polypeptide NEP II selon l'invention est particulièrement utile pour le criblage de composés inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II utiles pour la fabrication de médicament destiné à traiter les troubles impliquant les transmissions peptidergiques auxquelles participe NEP II.

Parmi les troubles en cause, on peut citer notamment les  
25 maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, les troubles de la croissance d'origine endocrinienne, les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les affections endocriniennes. Sont plus particulièrement visés les troubles affectant le métabolisme des neurohormones ou facteurs de la sphère corticotrope.

30

Les composés substrats de NEP II ou inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenus selon les procédés décrits précédemment peuvent également être utiles pour détecter la protéine NEP II.

La présente invention a donc également pour objet un procédé  
5 de détection de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu tel que défini précédemment ou avec un composé inhibiteur de  
10 l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenu selon le procédé de criblage tel que défini précédemment, ledit composé substrat ou ledit composé inhibiteur étant marqué;

- détecter la présence dudit composé substrat ou dudit composé inhibiteur, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II

15 Par "composé substrat marqué" ou "inhibiteur marqué", on entend un composé substrat ou un composé inhibiteur marqué de manière détectable, par exemple par un groupement radioactif, enzymatique, fluorogène ou fluorescent, etc.

20 Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

#### **EXEMPLE 1 :**

##### **Clonage de l'ADNc codant pour NEP II chez le rat**

25 Des oligonucléotides dégénérés ont été obtenus à partir de l'alignement des séquences peptidiques des enzymes ECE, NEP I et Kell et de la délimitation des zones de forte homologie.

L'ARN total de différents tissus de rat (cerveau, intestin et testicules) a été soumis à une transcription inverse (RT) et amplifié par réaction en chaîne à la polymérase (PCR), à l'aide d'une paire  
30 d'oligonucléotides dégénérés sur la région N-terminale riche en résidus cystéine :

Les séquences de ces oligonucléotides dégénérés sont les suivantes :

DCYS2 CCC AAG (G/T)CG (A/G)G(A/G) CTG GTC

5 DCYS3 T(A/T)(C/T) GC(A/C/T/G) GG(A/T) GG(A/C) TGG

Ceci a permis d'amplifier un fragment de 420 paires de bases à partir de l'ARNt de testicule codant pour une phase ouverte de lecture qui présente une homologie de 76% avec la protéine NEP I. Cette séquence a été complétée par 3' et 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends), à partir  
10 d'ARNt de cerveau de de testicules. Les séquences ont été confirmées par la vérification de cinq clones différents pour chaque tissu et chaque amplification. L'ADNc complet (SEQ ID n° 1) a alors été cloné dans les vecteurs PCR2.1 et pcDNA3.1 (Invitrogen).

15

### EXEMPLE 2 :

#### Caractéristiques du polypeptide NEP II de rat

Le nouveau gène isolé code pour une protéine de 774 acides  
20 aminés (SEQ ID n° 2) qui, outre de fortes homologies avec les enzymes NEP I, ECE et Kell (52%, 40% et 28% d'identité en acides aminés, respectivement) possède la séquence consensus du site actif HEXXH, une région transmembranaire (acides aminés 24 à 40 sur la séquence SEQ ID n° 2) suivie  
25 de quatre résidus cystéine caractéristiques de cette famille, et sept sites potentiels de glycosylation. Trois épissages alternatifs ont été identifiés par séquençage des RACE et par RT-PCR. Un de ces épissages alternatifs élimine un site potentiel de glycosylation et pourrait affecter le transit de la  
protéine à la surface de la cellule ou son activité. Chaque épissage correspond par ailleurs à un exon de la NEP I, ce qui suggère une structure de  
30 gène similaire. Ces données démontrent une appartenance de cette nouvelle enzyme à la famille des métalloprotéases ECE/NEP/Kell. Son homologie marquante avec NEP I a conduit à la nommer NEP II.

**EXEMPLE 3 :****Clonage de l'ADNc codant pour NEP II chez l'homme**

5 Afin de cloner l'homologue humain de NEP II, deux oligonucléotides ont été conçus, basés sur la séquence protéique de NEP II de rat. Les séquences ont été choisies d'une part pour leur faible dégénérescence (comme par exemple un tryptophane, représenté par un seul codon dans le code génétique) et d'autre part pour leur degré de conservation  
10 (comme le site de liaison du zinc).

1- (H)EITHFD (SEQ ID n°28) ou 5' - CGA GAT CAC ACA TGG CTT TGA  
TGA - 3' (S) (SEQ ID n°22)

2- QVWCGS (SEQ ID n°29) ou 5'- GGA CCC ACA CCA CAC CTG - 3' (AS)  
(SEQ ID n°23)

15 Une réaction en chaîne à la polymérase a été effectuée sur de l'ADNc d'hippocampe humain obtenu à partir d'une banque (Stratagene), et une bande de 330 pb a été amplifiée, sous-clonée et séquencée (SEQ ID n°3). La séquence obtenue présente une homologie de séquence de 82 % avec la NEPII de rat, ce qui permet d'affirmer qu'elle code pour l'homologue humain.

20 La présence du site de liaison du zinc HEITH a été confirmée par 5' RACE à l'aide des oligonucléotides HNII-2 et HNII-3, spécifiques à l'humain. De même, les oligonucléotides HNII-1 et HNII-2 permettront l'amplification de la région 3' par la technique de 3' RACE.

HNII-1 5'- CGG CCT GGA TCT CAC CCA TGA G - 3' (SEQ ID n°24)

25 HNII-2 5'- CTG ACT GCT CCC GGA AGT GCT GGG TG - 3' (SEQ ID n°25)

HNII-3 5'- GAG CAG CTC TTC TTC ATC - 3' (SEQ ID n°26)

HNII-4 5'- CTC CAC CAA TCC ATC ATG TTG C - 3' (SEQ ID n°27).

**EXEMPLE 4 :****Expression tissulaire de NEP II**

5 Des études de Northern-blot et de RT-PCR montrent que NEP II est codé par un transcrit de 2,8 Kb très fortement exprimé dans les testicules de rat et, modérément, dans le coeur, le foie, le système digestif et le cerveau. Des études de RT-PCR semi-quantitatives montrent un profil d'expression similaire dans ces tissus ainsi qu'une prédominance des formes longues.

10 Toutes ces caractéristiques indiquent clairement que la protéine identifiée pour la première fois est une métalloprotéase membranaire (ectoprotéase) responsable du métabolisme de peptides messagers neuronaux et/ou hormonaux.

Le polypeptide NEP II natif est exprimé de manière hétérogène  
15 dans le système nerveux, les glandes (hypophyse, testicule), l'appareil digestif (intestin grêle notamment), l'appareil cardiovasculaire (coeur notamment).

Les techniques d'hybridation *in situ* indiquent en outre une forte expression de la protéine NEP II dans les neurones et les cellules adénohypophysaires exprimant le gène de la POMC (propiomélanocortine),  
20 précurseur de l'ACTH.

Ces localisations indiquent la participation de NEP II dans la protéolyse d'hormones et de neurotransmetteurs peptidergiques ou de leurs précurseurs émanant de ou agissant sur ces divers organes. Il devient dès lors intéressant dans un but thérapeutique d'affecter les transmissions  
25 peptidergiques correspondantes en inhibant NEP II.

## REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi  
5 la séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, une séquence dérivée ou  
homologue de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ou un fragment  
biologiquement actif de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ledit  
polypeptide isolé étant désigné par «NEP II ».
2. Acide nucléique isolé comprenant une séquence nucléotidique choisie  
10 parmi la séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n° 3, une séquence dérivée ou  
homologue de ladite séquence SEQ ID n°1 ou n° 3, ou leurs séquences  
complémentaires.
3. Sonde oligonucléotidique hybridant spécifiquement avec une séquence  
nucléotidique selon la revendication 2, ladite sonde ayant une séquence  
15 nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID n°5 à SEQ ID n°27.
4. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence  
nucléotidique selon la revendication 2.
5. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 4.
6. Anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques  
20 ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un  
polypeptide selon la revendication 1 administré à un animal, et sont  
capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon la  
revendication 1.
7. Procédé de détection immunologique de NEP II dans un échantillon  
25 cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les  
étapes consistant à :
  - mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire,  
lesdites cellules ou ledit tissu avec un anticorps détectable selon la  
revendication 6 ;
  - 30 - détecter la présence dudit anticorps, indicatrice de la présence  
du polypeptide NEP II.



8. Procédé de détection de l'expression du polypeptide NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à :
- préparer l'ARN dudit échantillon ou desdites cellules ou dudit tissu;
  - mettre en contact ledit ARN obtenu avec au moins une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique selon la revendication 2, ladite sonde pouvant être notamment une sonde oligonucléotidique selon la revendication 3 ;
  - détecter la présence d'ARNm hybridant avec ladite sonde, indicatrice de l'expression du polypeptide NEP II.
9. Procédé d'identification de composés substrats du polypeptide NEP II selon la revendication 1, dans lequel on met en contact lesdits composés, éventuellement marqués, avec le polypeptide NEP II, et on évalue la coupure desdits composés par NEP II, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II envers lesdits composés substrats.
10. Procédé de détection de l'activité métalloprotéasique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :
- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu selon le procédé de la revendication 9, ledit composé substrat étant éventuellement marqué ;
  - évaluer la coupure dudit composé substrat, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II.
11. Procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique du polypeptide NEP II selon la revendication 1, dans lequel on met en contact lesdits composés avec ledit polypeptide NEP II et on évalue le taux d'inhibition de l'activité métalloprotéasique de NEP II.
12. Procédé de détection de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu selon le procédé de la revendication 9 ou avec un composé inhibiteur de l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenu selon le procédé de criblage de la revendication 11, ledit composé substrat ou ledit composé inhibiteur étant marqué ;

- détecter la présence dudit composé substrat ou dudit composé inhibiteur, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.

13. Utilisation du polypeptide NEP II selon la revendication 1 pour le criblage de composés inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II utiles pour la fabrication de médicament destiné à traiter les troubles impliquant les transmissions peptidergiques auxquelles participe NEP II.

14. Utilisation selon la revendication 13 dans laquelle lesdits troubles sont choisis parmi les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, les troubles de la croissance d'origine endocrinienne, les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les affections endocriniennes.

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM

<120> Nouvelle métalloprotéase membranaire NEP II et son utilisation pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie

<130> BET 99/0150

<140>

<141>

<150> FR/9804389

<151> 1998-04-08

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2765

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<220>

<221> CDS

<222> (107) ... (2428)

<400> 1

GCAAAGCACT AGCTTCAGTG TGCTCAAGGC ATCCAAGCTC CAGCTGCCTC CCTCCTGGCC 60

CTGGCCCTGG GTGCTCAGCT GTGTGCCTTC CACCCAGAAC CGGCTG ATG GGG AAG 115  
Met Gly Lys  
1

TCG GAG AGC TCA GTG GGG ATG ATG GAG AGA GCG GAC AAC TGT GGG AGG 163  
Ser Glu Ser Ser Val Gly Met Met Glu Arg Ala Asp Asn Cys Gly Arg  
5 10 15

AGG CGC CTA GGC TTC GTG GAG TGT GGG CTG CTG GTA CTG CTG ACA CTG 211  
Arg Arg Leu Gly Phe Val Glu Cys Gly Leu Leu Val Leu Leu Thr Leu  
20 25 30 35

CTG TTG ATG GGA GCC ATA GTG ACT CTG GGT GTC TTC TAC AGC ATA GGG Leu Leu Met Gly Ala Ile Val Thr Leu Gly Val Phe Tyr Ser Ile Gly 40 45 50	259
AAG CAG CTG CCC CTC TTA AAT AGC CTG CTG CAC GTC TCC CGG CAT GAG Lys Gln Leu Pro Leu Leu Asn Ser Leu Leu His Val Ser Arg His Glu 55 60 65	307
AGG ACG GTT GTA AAA CGA GTC CTC AGA GAT TCA TCG CAG AAG AGT GAC Arg Thr Val Val Lys Arg Val Leu Arg Asp Ser Ser Gln Lys Ser Asp 70 75 80	355
ATC TGT ACT ACC CCA AGC TGC GTG ATA GCA GCT GCC AGA ATC CTC CAG Ile Cys Thr Thr Pro Ser Cys Val Ile Ala Ala Ala Arg Ile Leu Gln 85 90 95	403
AAC ATG GAC CAG TCA AAG AAA CCC TGC GAC AAC TTC TAT CAG TAT GCT Asn Met Asp Gln Ser Lys Lys Pro Cys Asp Asn Phe Tyr Gln Tyr Ala 100 105 110 115	451
TGC GGA GGC TGG CTA CGG CAC CAT GTG ATC CCC GAG ACC AAC TCC AGA Cys Gly Gly Trp Leu Arg His His Val Ile Pro Glu Thr Asn Ser Arg 120 125 130	499
TAC AGC GTC TTT GAC ATC CTT CGG GAT GAG CTG GAG GTC ATC CTC AAA Tyr Ser Val Phe Asp Ile Leu Arg Asp Glu Leu Glu Val Ile Leu Lys 135 140 145	547
GGG GTG CTG GAG GAT TCC TCT GTC CAG CAC CGC CCA GCT GTG GAG AAG Gly Val Leu Glu Asp Ser Ser Val Gln His Arg Pro Ala Val Glu Lys 150 155 160	595
GCC AAG ACA CTG TAC CGC TCC TGC ATG AAC CAG AGT GTG ATA GAG AAG Ala Lys Thr Leu Tyr Arg Ser Cys Met Asn Gln Ser Val Ile Glu Lys 165 170 175	643
AGA GAC TCT GAG CCC CTG CTG AAC GTC TTA GAT ATG ATA GGA GGT TGG Arg Asp Ser Glu Pro Leu Leu Asn Val Leu Asp Met Ile Gly Gly Trp 180 185 190 195	691
CCT GTA GCC ATG GAC AAG TGG AAT GAG ACC ATG GGC CCC AAG TGG GAA	739

Pro	Val	Ala	Met	Asp	Lys	Trp	Asn	Glu	Thr	Met	Gly	Pro	Lys	Trp	Glu		
				200					205						210		
CTG	GAG	CGG	CAG	TTG	GCT	GTG	TTG	AAC	TCG	CAG	TTC	AAC	AGG	CGC	GTC	787	
Leu	Glu	Arg	Gln	Leu	Ala	Val	Leu	Asn	Ser	Gln	Phe	Asn	Arg	Arg	Val		
			215					220					225				
CTC	ATC	GAC	CTC	TTC	ATC	TGG	AAT	GAT	GAC	CAG	AAC	TCC	AGC	CGG	CAC	835	
Leu	Ile	Asp	Leu	Phe	Ile	Trp	Asn	Asp	Asp	Gln	Asn	Ser	Ser	Arg	His		
		230					235					240					
GTC	ATC	TAC	ATA	GAC	CAG	CCC	ACC	TTG	GGC	ATG	CCC	TCC	CGG	GAG	TAC	883	
Val	Ile	Tyr	Ile	Asp	Gln	Pro	Thr	Leu	Gly	Met	Pro	Ser	Arg	Glu	Tyr		
	245					250					255						
TAT	TTC	AAG	GAA	GAC	AGC	CAC	CGG	GTA	CGG	GAA	GCC	TAC	CTG	CAG	TTC	931	
Tyr	Phe	Lys	Glu	Asp	Ser	His	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gln	Phe		
260					265					270					275		
ATG	ACA	TCA	GTG	GCC	ACT	ATG	CTG	AGG	AGA	GAC	CTG	AAC	CTG	CCC	GGG	979	
Met	Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Met	Leu	Arg	Arg	Asp	Leu	Asn	Leu	Pro	Gly		
				280					285					290			
GAG	ACC	GAT	TTG	GTG	CAG	GAG	GAA	ATG	GCA	CAG	GTG	CTG	CAT	CTG	GAG	1027	
Glu	Thr	Asp	Leu	Val	Gln	Glu	Glu	Met	Ala	Gln	Val	Leu	His	Leu	Glu		
			295					300					305				
ACA	CAT	CTG	GCC	AAC	GCC	ACG	GTC	CCC	CAG	GAG	AAA	AGG	CAT	GAT	GTC	1075	
Thr	His	Leu	Ala	Asn	Ala	Thr	Val	Pro	Gln	Glu	Lys	Arg	His	Asp	Val		
		310					315					320					
ACC	GCC	CTG	TAT	CAC	CGA	ATG	GGC	CTG	GAG	GAG	CTG	CAG	GAA	AGG	TTT	1123	
Thr	Ala	Leu	Tyr	His	Arg	Met	Gly	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Glu	Arg	Phe		
	325					330					335						
GGT	CTG	AAG	GGG	TTT	AAC	TGG	ACT	CTC	TTC	ATA	CAA	AAC	GTG	CTG	TCT	1171	
Gly	Leu	Lys	Gly	Phe	Asn	Trp	Thr	Leu	Phe	Ile	Gln	Asn	Val	Leu	Ser		
340					345					350					355		
TCT	GTG	CAA	GTT	GAG	CTG	CTC	CCG	AAT	GAG	GAG	GTG	GTG	GTC	TAT	GGC	1219	
Ser	Val	Gln	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Asn	Glu	Glu	Val	Val	Val	Tyr	Gly		
				360					365					370			

ATC CCC TAC CTG GAG AAT CTT GAG GAG ATC ATT GAC GTC TTC CCA GCA Ile Pro Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ile Asp Val Phe Pro Ala 375 380 385	1267
CAG ACC TTG CAA AAC TAC CTG GTG TGG CGC CTG GTG CTA GAT CGC ATC Gln Thr Leu Gln Asn Tyr Leu Val Trp Arg Leu Val Leu Asp Arg Ile 390 395 400	1315
GGC AGC CTG AGC CAG AGA TTC AAA GAA GCG CGT GTG GAC TAC CGC AAG Gly Ser Leu Ser Gln Arg Phe Lys Glu Ala Arg Val Asp Tyr Arg Lys 405 410 415	1363
GCG CTG TAC GGT ACA ACC ATG GAG GAA GTA CGC TGG CGG GAG TGT GTC Ala Leu Tyr Gly Thr Thr Met Glu Glu Val Arg Trp Arg Glu Cys Val 420 425 430 435	1411
AGC TAT GTC AAC AGC AAC ATG GAG AGT GCC GTG GGC TCC CTC TAC ATC Ser Tyr Val Asn Ser Asn Met Glu Ser Ala Val Gly Ser Leu Tyr Ile 440 445 450	1459
AAG CGG GCC TTC TCC AAG GAC AGC AAG AGC ATA GTC AGT GAG CTT ATC Lys Arg Ala Phe Ser Lys Asp Ser Lys Ser Ile Val Ser Glu Leu Ile 455 460 465	1507
GAG AAG ATA CGG TCC GTG TTT GTG GAT AAC CTG GAC GAG TTG AAC TGG Glu Lys Ile Arg Ser Val Phe Val Asp Asn Leu Asp Glu Leu Asn Trp 470 475 480	1555
ATG GAT GAG GAA TCC AAG AAA AAG GCC CAG GAA AAG GCC TTG AAT ATC Met Asp Glu Glu Ser Lys Lys Lys Ala Gln Glu Lys Ala Leu Asn Ile 485 490 495	1603
CGG GAA CAG ATC GGC TAC CCT GAC TAC ATT TTG GAA GAC AAT AAC AGA Arg Glu Gln Ile Gly Tyr Pro Asp Tyr Ile Leu Glu Asp Asn Asn Arg 500 505 510 515	1651
CAC CTG GAT GAG GAA TAC TCC AGT CTG ACT TTC TCA GAG GAC CTG TAT His Leu Asp Glu Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asp Leu Tyr 520 525 530	1699
TTT GAG AAC GGG CTT CAG AAC CTC AAG AAC AAT GCC CAA AGG AGC CTC	1747

Phe	Glu	Asn	Gly	Leu	Gln	Asn	Leu	Lys	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Ser	Leu	
			535					540					545			
AAG	AAA	CTT	CGG	GAA	AAG	GTG	GAC	CAG	AAT	CTC	TGG	ATC	ATT	GGG	GCT	1795
Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Lys	Val	Asp	Gln	Asn	Leu	Trp	Ile	Ile	Gly	Ala	
		550					555					560				
GCA	GTG	GTC	AAT	GCA	TTC	TAC	TCC	CCA	AAC	AGA	AAC	CTG	ATC	GTC	TTT	1843
Ala	Val	Val	Asn	Ala	Phe	Tyr	Ser	Pro	Asn	Arg	Asn	Leu	Ile	Val	Phe	
	565					570					575					
CCA	GCG	GGG	ATC	CTC	CAG	CCA	CCC	TTC	TTC	AGC	AAG	GAC	CAA	CCA	CAG	1891
Pro	Ala	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Pro	Phe	Phe	Ser	Lys	Asp	Gln	Pro	Gln	
580					585					590					595	
GCC	TTG	AAT	TTC	GGG	GGC	ATC	GGG	ATG	GTG	ATT	GGA	CAC	GAG	ATC	ACA	1939
Ala	Leu	Asn	Phe	Gly	Gly	Ile	Gly	Met	Val	Ile	Gly	His	Glu	Ile	Thr	
			600					605					610			
CAC	GGC	TTT	GAT	GAT	AAC	GGT	CGG	AAC	TTT	GAC	AAG	AAT	GGC	AAC	ATG	1987
His	Gly	Phe	Asp	Asp	Asn	Gly	Arg	Asn	Phe	Asp	Lys	Asn	Gly	Asn	Met	
			615					620					625			
CTG	GAC	TGG	TGG	AGC	AAC	TTC	TCG	GCC	CGG	CAC	TTC	CGA	CAG	CAG	TCA	2035
Leu	Asp	Trp	Trp	Ser	Asn	Phe	Ser	Ala	Arg	His	Phe	Arg	Gln	Gln	Ser	
		630					635					640				
CAG	TGT	ATG	ATT	TAT	CAG	TAC	AGC	AAC	TTC	TCT	TGG	GAA	CTA	GCA	GAC	2083
Gln	Cys	Met	Ile	Tyr	Gln	Tyr	Ser	Asn	Phe	Ser	Trp	Glu	Leu	Ala	Asp	
	645					650					655					
AAC	CAG	AAT	GTG	AAC	GGA	TTC	AGC	ACC	CTC	GGG	GAG	AAC	ATC	GCC	GAC	2131
Asn	Gln	Asn	Val	Asn	Gly	Phe	Ser	Thr	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	
660					665					670					675	
AAC	GGC	GGT	GTG	CGG	CAG	GCA	TAC	AAG	GCT	TAC	CTA	CAG	TGG	CTA	GCT	2179
Asn	Gly	Gly	Val	Arg	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Leu	Ala	
			680					685					690			
GAA	GGC	GGC	AGA	GAC	CAG	AGA	CTG	CCG	GGA	CTG	AAC	CTG	ACC	TAT	GCT	2227
Glu	Gly	Gly	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Gly	Leu	Asn	Leu	Thr	Tyr	Ala	
			695					700					705			

CAG CTT TTC TTC ATT AAC TAT GCC CAG GTG TGG TGT GGG TCC TAC AGG 2275  
 Gln Leu Phe Phe Ile Asn Tyr Ala Gln Val Trp Cys Gly Ser Tyr Arg  
 710 715 720

CCG GAG TTC GCC ATC CAG TCC ATC AAG ACA GAT GTC CAC AGT CCT CTT 2323  
 Pro Glu Phe Ala Ile Gln Ser Ile Lys Thr Asp Val His Ser Pro Leu  
 725 730 735

AAG TAC AGG GTG CTG GGC TCA CTA CAG AAC CTA CCA GGC TTC TCT GAG 2371  
 Lys Tyr Arg Val Leu Gly Ser Leu Gln Asn Leu Pro Gly Phe Ser Glu  
 740 745 750 755

GCG TTC CAC TGC CCA CGA GGC AGC CCC ATG CAC CCT ATG AAT CGA TGT 2419  
 Ala Phe His Cys Pro Arg Gly Ser Pro Met His Pro Met Asn Arg Cys  
 760 765 770

CGC ATC TGG TAGCCAAGGC TGAGCTATGC TCGGGCCAC GCCCCGCCAC 2468  
 Arg Ile Trp

CCAGAGGCTT CGTGAATGGT GTAGCCGGCA TAGATGTGCA GGTGTTGCC TGAAGGCCAC 2528

TGGAGCCACC AGCCAGCCCT CCGCGCCCGAG CCTAGAGGGC AGCCACCCGC CCACATCTGG 2588

GATGAGTGGT GGTGCCTGGT CCTGCGCCTT TTCCGGCCAG TGAGGGTCAG CGGCCCGGTA 2648

GGAGCAGTCA GCTGTCCCCC ACCCTCTTCA TAGTGTGTGG CTAATGTCC TCGAGCTTCA 2708

GACTTGAGCT AAGTAAACGC TTCAAAGAAG GCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGGG 2765

<210> 2  
 <211> 774  
 <212> PRT  
 <213> Rattus rattus

<400> 2  
 Met Gly Lys Ser Glu Ser Ser Val Gly Met Met Glu Arg Ala Asp Asn  
 1 5 10 15



Cys Gly Arg Arg Arg Leu Gly Phe Val Glu Cys Gly Leu Leu Val Leu  
 20 25 30  
 Leu Thr Leu Leu Leu Met Gly Ala Ile Val Thr Leu Gly Val Phe Tyr  
 35 40 45  
 Ser Ile Gly Lys Gln Leu Pro Leu Leu Asn Ser Leu Leu His Val Ser  
 50 55 60  
 Arg His Glu Arg Thr Val Val Lys Arg Val Leu Arg Asp Ser Ser Gln  
 65 70 75 80  
 Lys Ser Asp Ile Cys Thr Thr Pro Ser Cys Val Ile Ala Ala Ala Arg  
 85 90 95  
 Ile Leu Gln Asn Met Asp Gln Ser Lys Lys Pro Cys Asp Asn Phe Tyr  
 100 105 110  
 Gln Tyr Ala Cys Gly Gly Trp Leu Arg His His Val Ile Pro Glu Thr  
 115 120 125  
 Asn Ser Arg Tyr Ser Val Phe Asp Ile Leu Arg Asp Glu Leu Glu Val  
 130 135 140  
 Ile Leu Lys Gly Val Leu Glu Asp Ser Ser Val Gln His Arg Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Lys Ala Lys Thr Leu Tyr Arg Ser Cys Met Asn Gln Ser Val  
 165 170 175  
 Ile Glu Lys Arg Asp Ser Glu Pro Leu Leu Asn Val Leu Asp Met Ile  
 180 185 190  
 Gly Gly Trp Pro Val Ala Met Asp Lys Trp Asn Glu Thr Met Gly Pro  
 195 200 205  
 Lys Trp Glu Leu Glu Arg Gln Leu Ala Val Leu Asn Ser Gln Phe Asn  
 210 215 220  
 Arg Arg Val Leu Ile Asp Leu Phe Ile Trp Asn Asp Asp Gln Asn Ser  
 225 230 235 240

Ser Arg His Val Ile Tyr Ile Asp Gln Pro Thr Leu Gly Met Pro Ser  
 245 250 255  
 Arg Glu Tyr Tyr Phe Lys Glu Asp Ser His Arg Val Arg Glu Ala Tyr  
 260 265 270  
 Leu Gln Phe Met Thr Ser Val Ala Thr Met Leu Arg Arg Asp Leu Asn  
 275 280 285  
 Leu Pro Gly Glu Thr Asp Leu Val Gln Glu Glu Met Ala Gln Val Leu  
 290 295 300  
 His Leu Glu Thr His Leu Ala Asn Ala Thr Val Pro Gln Glu Lys Arg  
 305 310 315 320  
 His Asp Val Thr Ala Leu Tyr His Arg Met Gly Leu Glu Glu Leu Gln  
 325 330 335  
 Glu Arg Phe Gly Leu Lys Gly Phe Asn Trp Thr Leu Phe Ile Gln Asn  
 340 345 350  
 Val Leu Ser Ser Val Gln Val Glu Leu Leu Pro Asn Glu Glu Val Val  
 355 360 365  
 Val Tyr Gly Ile Pro Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ile Asp Val  
 370 375 380  
 Phe Pro Ala Gln Thr Leu Gln Asn Tyr Leu Val Trp Arg Leu Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gln Arg Phe Lys Glu Ala Arg Val Asp  
 405 410 415  
 Tyr Arg Lys Ala Leu Tyr Gly Thr Thr Met Glu Glu Val Arg Trp Arg  
 420 425 430  
 Glu Cys Val Ser Tyr Val Asn Ser Asn Met Glu Ser Ala Val Gly Ser  
 435 440 445  
 Leu Tyr Ile Lys Arg Ala Phe Ser Lys Asp Ser Lys Ser Ile Val Ser  
 450 455 460

Glu Leu Ile Glu Lys Ile Arg Ser Val Phe Val Asp Asn Leu Asp Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Asn Trp Met Asp Glu Glu Ser Lys Lys Lys Ala Gln Glu Lys Ala  
 485 490 495  
 Leu Asn Ile Arg Glu Gln Ile Gly Tyr Pro Asp Tyr Ile Leu Glu Asp  
 500 505 510  
 Asn Asn Arg His Leu Asp Glu Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Phe Ser Glu  
 515 520 525  
 Asp Leu Tyr Phe Glu Asn Gly Leu Gln Asn Leu Lys Asn Asn Ala Gln  
 530 535 540  
 Arg Ser Leu Lys Lys Leu Arg Glu Lys Val Asp Gln Asn Leu Trp Ile  
 545 550 555 560  
 Ile Gly Ala Ala Val Val Asn Ala Phe Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Leu  
 565 570 575  
 Ile Val Phe Pro Ala Gly Ile Leu Gln Pro Pro Phe Phe Ser Lys Asp  
 580 585 590  
 Gln Pro Gln Ala Leu Asn Phe Gly Gly Ile Gly Met Val Ile Gly His  
 595 600 605  
 Glu Ile Thr His Gly Phe Asp Asp Asn Gly Arg Asn Phe Asp Lys Asn  
 610 615 620  
 Gly Asn Met Leu Asp Trp Trp Ser Asn Phe Ser Ala Arg His Phe Arg  
 625 630 635 640  
 Gln Gln Ser Gln Cys Met Ile Tyr Gln Tyr Ser Asn Phe Ser Trp Glu  
 645 650 655  
 Leu Ala Asp Asn Gln Asn Val Asn Gly Phe Ser Thr Leu Gly Glu Asn  
 660 665 670  
 Ile Ala Asp Asn Gly Gly Val Arg Gln Ala Tyr Lys Ala Tyr Leu Gln  
 675 680 685

Trp Leu Ala Glu Gly Gly Arg Asp Gln Arg Leu Pro Gly Leu Asn Leu  
 690 695 700

Thr Tyr Ala Gln Leu Phe Phe Ile Asn Tyr Ala Gln Val Trp Cys Gly  
 705 710 715 720

Ser Tyr Arg Pro Glu Phe Ala Ile Gln Ser Ile Lys Thr Asp Val His  
 725 730 735

Ser Pro Leu Lys Tyr Arg Val Leu Gly Ser Leu Gln Asn Leu Pro Gly  
 740 745 750

Phe Ser Glu Ala Phe His Cys Pro Arg Gly Ser Pro Met His Pro Met  
 755 760 765

Asn Arg Cys Arg Ile Trp  
 770

<210> 3  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 GGGCACGAGA TCACGCACGG CTTTGATGAC AATGGCCGGA ACTTCGACAA GAATGGCAAC 60  
 ATGATGGATT GGTGGAGTAA CTTCTCCACC CAGCACTTCC GGGAGCAGTC AGAGTGCATG 120  
 ATCTACCACT ACGGCAACTA CTCCTGGGAC CTGGCAGACG AACAGAACGT GAACGGATTG 180  
 AACACCCTTG GGGAAAACAT TGCTGACAAC GGAGGGGTGC GGCAAGCCTA TAAGGCCTAC 240  
 CTCAAGTGA TGGCAGAGGG TGGCAAGGAC CAGCAGCTGC CCGGCCTGGA TCTCACCCAT 300  
 GAGCAGCTCT TCTTCATCAA CTATGCC 327

<210> 4  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Gly His Glu Ile Thr His Gly Phe Asp Asp Asn Gly Arg Asn Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Asn Gly Asn Met Met Asp Trp Trp Ser Asn Phe Ser Thr Gln His  
 20 25 30  
 Phe Arg Glu Gln Ser Glu Cys Met Ile Tyr Gln Tyr Gly Asn Tyr Ser  
 35 40 45  
 Trp Asp Leu Ala Asp Glu Gln Asn Val Asn Gly Phe Asn Thr Leu Gly  
 50 55 60  
 Glu Asn Ile Ala Asp Asn Gly Gly Val Arg Gln Ala Tyr Lys Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Trp Met Ala Glu Gly Gly Lys Asp Gln Gln Leu Pro Gly Leu  
 85 90 95  
 Asp Leu Thr His Glu Gln Leu Phe Phe Ile Asn Tyr Ala Gln Val Trp  
 100 105 110  
 Cys Gly Cys Lys  
 115

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> séquence artificielle  
 <223> oligonucléotide

<400> 5  
 TGGAGCGGCA GTTGGCTGTG 20

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> séquence artificielle  
 <223> oligonucléotide

<400> 6  
 AGTTCCTACT TGGGGCCCAT G 21

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 7  
GCTGGAGGAT TCCTCTGTCC

20

<210> 8  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 8  
CGGGGATCAC ATGGTGCCG

19

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 9  
CTACCCAAG CTGCGTGATA G

21

<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 10  
CGGCACCATG TGATCCCCGA G

21

<210> 11  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 11  
GCAAAGCACT AGCTTCAGTG TG 22

<210> 12  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 12  
GGTCATCATT CCAGATGAAG AG 22

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 13  
CGATGAGGAC GCGCCTGTTG 20

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 14  
TGCAGGAAAG GTTTGGTCTG 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 15  
GAACGCCTCA GAGAAGCCTG 20

<210> 16  
<211> 20

<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 16  
ATGACCAGAA CTCCAGCCGG 20

<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 17  
CATCATGCTT TTTCTCCTGG G 21

<210> 18  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 18  
CCCGAAGTTT CTGAGGCTC C 21

<210> 19  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 19  
GATCGGCTAC CCTGACTAC 19

<210> 20  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> séquence artificielle  
<223> oligonucléotide

<400> 20



GTTCGCCATC CAGTCCATC	19
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> séquence artificielle	
<223> oligonucléotide	
<400> 21	
CGAAGCCTAG GCGCCTCCTC	20
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> séquence artificielle	
<223> oligonucléotide	
<400> 22	
cgagatcaca catggctttg atga	24
<210> 23	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> séquence artificielle	
<223> oligonucléotide	
<400> 23	
ggacccacac cacacctg	18
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> séquence artificielle	
<223> oligonucléotide	
<400> 24	
cggcctggat ctcacccatg ag	22
<210> 25	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> séquence artificielle	

<223> oligonucléotide

<400> 25

ctgactgctc ccggaagtgc tgggtg

26

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<223> oligonucléotide

<400> 26

gagcagctct tcttcatc

18

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<223> oligonucléotide

<400> 27

ctccaccaat ccatcatggt gc

22

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<223> séquence protéique correspondant à la sonde oligonucléotidique SEQ ID n°22

<400> 28

Glu Ile Thr His Phe Asp

1

5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<223> séquence protéique correspondant à la sonde oligonucléotidique SEQ ID n°23

<400> 29

Gln Val Trp Cys Gly Ser

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00807

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C12N15/57 C12N9/64 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/573  
 C12Q1/68 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 272 928 A (GENENTECH INC) 29 June 1988 -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 1999

Date of mailing of the international search report

08/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00807

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0272928 A	29-06-1988	US 4960700 A	02-10-1990
		AT 119936 T	15-04-1995
		AU 616876 B	14-11-1991
		AU 8305787 A	30-06-1988
		AU 623845 B	28-05-1992
		AU 8305887 A	30-06-1988
		DE 3751169 D	20-04-1995
		DE 3751169 T	26-10-1995
		DK 684087 A	03-10-1988
		EP 0272929 A	29-06-1988
		EP 0596355 A	11-05-1994
		ES 2072251 T	16-07-1995
		IE 66333 B	27-12-1995
		IL 84928 A	27-02-1994
		JP 1172344 A	07-07-1989
		JP 2685468 B	03-12-1997
		US 5780025 A	14-07-1998
		CA 1322160 A	14-09-1993
		DE 3751748 D	25-04-1996
		DE 3751748 T	14-11-1996
		DK 684487 A	07-10-1990

---

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C n de internationale No  
PCT/FR 99/00807

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C12N15/57 C12N9/64 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/573 C12Q1/68 C12Q1/37		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C07K G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 272 928 A (GENENTECH INC) 29 juin 1988 -----	
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
<b>Catégories spéciales de documents cités:</b>		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 1 juillet 1999		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 08/07/1999
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Van der Schaal, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Inde Internationale No

PCT/FR 99/00807

Document brevet cite au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets)	Date de publication
EP 0272928 A	29-06-1988	US 4960700 A	02-10-1990
		AT 119936 T	15-04-1995
		AU 616876 B	14-11-1991
		AU 8305787 A	30-06-1988
		AU 623845 B	28-05-1992
		AU 8305887 A	30-06-1988
		DE 3751169 D	20-04-1995
		DE 3751169 T	26-10-1995
		DK 684087 A	03-10-1988
		EP 0272929 A	29-06-1988
		EP 0596355 A	11-05-1994
		ES 2072251 T	16-07-1995
		IE 66333 B	27-12-1995
		IL 84928 A	27-02-1994
		JP 1172344 A	07-07-1989
		JP 2685468 B	03-12-1997
		US 5780025 A	14-07-1998
		CA 1322160 A	14-09-1993
		DE 3751748 D	25-04-1996
		DE 3751748 T	14-11-1996
		DK 684487 A	07-10-1990

---